

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

AN 1989-334994 [46] WPIDS
DNC C1989-148420

TI Redn. of beta keto acid - by addn. of at least one metal ion of e.g. iron
aluminium chromium, cerium or indium.

DC D16 E19

PA (NISY) NIPPON SYNTHETIC CHEM IND CO

CYC 1

PI JP 01222787 A 19890906 (198946)* 4p <--

PRAI JP 1988-48010 19880229

AN 1989-334994 [46] WPIDS

AB JP 01222787 A UPAB: 19930923

Method of reducing beta-keto acids comprises adding at least one of metal
ion selected from iron, aluminium, chromium, cerium or indium in the
system of reducing beta-keto acids to beta-hydroxycarboxylic acids by a
microorganism.

USE/ADVANTAGE - Useful for producing optically active
beta-hydroxycarboxylic acids, in high optical purity, yield and
reproducibility.

In an example *Saccharomyces cerevisiae* was cultured and collected by
centrifugation. The microorganism 39 g (dry weight) was added in a soln.
(glucose 7.5 g, H₂O 270 g, ferric nitrate 0.4 g and acetoacetic ethyl 19.2
g) and they were stirred for 5 hrs. at 30 deg.C. Then, beta-hydroxybutyric
ethyl 17.5 g was extracted. The yield was 89.7% and the optical purity of
(S) body was 95% ee. (When ferric nitrate was not added, the yield was
only 60% and the optical purity was only 90%).

0/0

⑪公開特許公報(A)

平1-222787

⑤Int.Cl.

C 12 P 7/42
C 12 N 1/20

識別記号

庁内整理番号

⑩公開 平成1年(1989)9月6日

6926-4B
A-8515-4B

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑪発明の名称 β -ケト酸類の還元方法

⑪特 願 昭63-48010

⑪出 願 昭63(1988)2月29日

⑪発明者 長谷川 昌康 京都府京都市伏見区深草坊町35

⑪発明者 本田 洋 大阪府枚方市香里ヶ丘8-31-1

⑪発明者 岡村 育子 兵庫県尼崎市浜3丁目21-5

⑪出願人 日本合成化学工業株式 大阪府大阪市北区野崎町9番6号
会社

明細書

1. 発明の名称

 β -ケト酸類の還元方法

2. 特許請求の範囲

1. β -ケト基を還元する性能を有する酵を用いて β -ケト酸類を還元して対応する β -ヒドロキシカルボン酸類を製造するに当たり、系内に鉄、アルミニウム、クロム、セリウム及びインジウムの群から選ばれる金属イオンの少なくとも一種を、共存させることを特徴とする β -ケト酸類の還元方法。
2. β -ケト酸類がアセト酢酸エステルであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の還元方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、アセト酢酸エステル等の β -ケト酸類を微生物的に還元して、光学活性の β -ヒドロキシカルボン酸類を製造する方法に関するものである。この β -ヒド

ロキシカルボン酸類は、不斉炭素骨格を持つので、チエナマイシン(抗生素質)等の光学活性物質合成のための修饰剤として用いられ、有用性の高い物質である。

〔従来の技術〕

アセト酢酸エステルの不斉還元による β (R)-ヒドロキシ酪酸エステルの従来の製造法としては、(イ)有機合成による方法、(ロ)微生物による方法等がある。(イ)法としては(R,R)-酒石酸修飾ラネイニッケルを触媒として用いる報告(日本化学会誌 10, 1270 (1986)、特開昭60-36442号公報)等があり、(ロ)法としては、菌株としてジエオ・リカム・カンジダム(Geotrichum Canadum)を用いる報告(Helv. Chim. Acta, 66, 485 (1983))がある。

〔発明が解決しようとする問題点〕

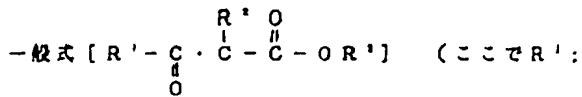
上記の(イ)法についてはまだ光学純度の高いものは得られておらず、又、触媒が高価であり、(ロ)法については、収率が低く、再現性が悪いなどの問題点がある。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、上記の如き問題点を解決するため幾種研究を重ねた結果、 β -ケト基を還元する性能を有する

菌を用いて β -ケト酸類を還元して対応する β -ヒドロキシカルボン酸類を製造するに当たり、系内に鉄、アルミニウム、クロム、セリウム及びインジウムの群から選ばれる金属イオンの少なくとも一種を共存させる場合、收率良く高純度の目的物が得られることを見出し本発明を完成するに至った。

本発明で対象とする β -ケト酸類は、



水素、アルキル基、ハロゲン化アルキル基、アリル基、アリール基等、R' : 水素、アルキル基、ハロゲン、アリール基、アリル基等、R' : 水素、アルキル基、アリル基、アリール基等をそれぞれ表す)で示されるもので代表的にはアセト酢酸、アセト酢酸アルキルエステル、 α -ハロアセト酢酸アルキルエステル、 α -ハロアセト酢酸アルキルエステル、アセト酢酸アリルエステル、 α -ハロアセト酢酸アリルエステル、 α -ハロアセト酢酸アリルエステル、プロピオニル酢酸、プロピオニル酢酸エステル、ベンゾイル酢酸、ベンゾイル酢酸エステル、

トルラ・ミヌタ (IFO 0920)、デバリオマイセス・スブグロボサス (IFO 0794)、デバリオマイセス・サケ (IFO 0060)、トルロブシス・コリクロサ (IFO 0381)、トルロブシス・カンジダ (IFO 0380)、トリコスボロン・クタニウム (IFO 0173)、トリコスボロン・ファーメンクス (IFO 1199)、オーレオバシジウム・ブルラシス (IFO 4484)、オーレオバシジウム・マンソニー (IFO 6421)、グリオクラジウム・ビレンス (IFO 6355) グリオクラジウム・ロセウム (IFO 5422)、アスペルギルス・フラブス (IFO 4295)、アスペルギルス・ペルシカラ (IFO 4105) 等がある。

本発明で用いる菌株の培養には各種培地が考えられるが、炭素源としては各種糖類、デンプン類等があり、窒素源として酵母エキス、肉エキス、ペプトン、コーンスチーブリカ、無機塩類等がある。他に、N₂、K₂、Mg、P、Cl等の無機成分やビタミン類等を適量添加する。

反応方法としては、水系(水、生理食塩水、バッファ液、培地等)に該菌株の培養液、休止菌体又は乾燥菌体の単独又は混合物を分散させ、エネルギー源として

β -ケトベンタン酸エステル等が挙げられるが、アセト酢酸エステル類が実用的である。

本発明で用いる β -ケト基を還元する菌としてはトリコスボロン属、ロドトルラ属、デバリオマイセス属、クリプトコッカス属、トルロブシス属、カンジダ属、サッカロミセス属、オーレオバシジウム属、グリオクラジウム属、アスペルギルス属が含まれる。

具体的に例示すると

トリコスボロン・クタニウム (IFO 1198)、ロドトルラ・テキセンシス (IFO 0920)、ロドトルラ・ルブラ (IFO 1101)、デバリオマイセス・ハンセニー (IFO 0023)、デバリオマイセス・サブグロボサス (IFO 0794)、クリプトポッカス・ラウレンティー (IFO 0609)、クリプトポッカス・ネオフォーマンス (IFO 0410)、トルロブシス・カンジダ (IFO 0405)、トルロブシス・エリア (IFO 0881)、カンジダ・ユティリス (IFO 0396)、カンジダ・リポリティカ (IFO 0717)、サッカロミセス・セレビシアエ (IFO 0635)、サッカロミセス・ロゴス (IFO 0278)、サッカロミセス・カールスベルゲンシス (IFO 0481)、ロドトルラ・パリグ (IFO 0715)、ロド

糖類等を添加し、次いで β -ケト酸類を系中濃度が0.01~5.0重量%、好ましくは0.05~1.0重量%になるように加えて、1.0~7.0で好ましくは2.0~5.0℃、pH 3~8、好ましくは4~7で、0.1~1.0時間程度振とうあるいは攪拌、または静置すればよい。又、菌株を別途固定化して作用せしめたり、該菌株から分離した還元酵素を用いる等任意の方法が採用される。

反応形式としてはバッチ方式あるいは固定化された菌株を管や塔に充填し β -ケト酸類を流下させる連続方式等任意の手段が採用出来る。

かかる反応時の媒質は水のみならず水と相溶性のある有機溶剤例えばアルコール、アセトン等の水/有機溶媒混合系も用いられる。微生物に対して害とならない有機溶媒を選択することは勿論必要である。

系に対し β -ケト酸類はそのまま、または有機溶媒に溶解あるいは分散させて添加される。該酸類の系中濃度範囲は通常0.01~5.0重量%であり、0.01重量%未満の場合は反応的には不都合はないが経済的に実用性に乏しく、一方、5.0重量%より大きな場合は菌体への

負荷がかかりすぎ、収率が低下する等問題が生じやすい。

また、系中の濃度が10℃未満の場合は菌の活性が低下し、一方、70℃をこえる場合は菌の死滅が増し、いずれも収率が減少する。

系中のPHが3未満、又は、8より大きい場合は、いずれも菌の活性低下、死滅の増加がみられ収率が低下する。

反応時にグルコース等の糖類や微生物基質を共存させても差し支えない。かかる糖類や微生物基質の添加は反応の任意の段階で可能であり、一括、連続、分割のいずれの手段も実施できる。又、反応時間は0.1～100時間程度が実用的である。

本発明の特徴は、上記の反応時に鉄、アルミニウム、クロム、セリウム及びインジウムから選ばれる金属イオンの少なくとも一種を系に共存させる点である。該イオンは通常、塩の形、例えば硝酸塩、硫酸塩、ハロゲン化物、リン酸塩、酢酸塩等として系に添加される。添加量は塩として反応系に対して0.01～0.5%、金属イオンとして反応系に対して0.005～0.1%程度が効果的である。

24時間培養後、菌体を遠心分離にて集団し、水洗を1回行って8.5g(乾燥重量)のサッカロミセス・セレビシアを得た。かくして、得られた菌体を用いて還元反応を行った。

即ち、1L容丸底フラスコに菌体3.9g(乾燥重量)、グルコース7.5g、水27.0g、硝酸第二鉄(9水和物)0.4gを入れ、基質としてアセト酢酸エチル19.2g(0.148mol)を添加し、30℃にてプロペラ搅拌による反応を5時間行った後、抽出操作をした。即ち、ヘキサン200ccを加えて1時間搅拌を続け、エマルジョン化したものを遠心分離(5000rpm、20分)にかけて除菌し、得られたヘキサン層をロータリーエバボレーターにかけ、ヘキサンを留去して、18.0gの残渣を得た。ガスクロ、IR、NMR分析により、この残渣中に含まれるβ-ヒドロキシ酪酸エチルは17.5g(還元率89.7%)であり、その比旋光度は $[\alpha]^{20} + 43.1$ (C=1 クロロホロム)を示し、光学純度は(S)体95%eeであった。尚、この反応液組成において硝酸第二鉄の使用を省略した以外は全く同様に反応させた結果、還元率は60%であり(S)体光学純度は90%eeであった。

反応終了後は反応液を酢酸エチル、ヘキサン等の有機溶媒を用いて抽出後、溶媒を留去するか、菌株を遠心分離等の常法に従って分離し、直接蒸留により回収する方法等を用いて目的物を得る。

【作用】

本発明において、前述の金属イオンを共存させることにより、β-ケト酸類からβ-ヒドロキシカルボン酸類を効率よく製造でき、更に、従来の不斉還元による製造法と比較して光学純度、収率及び再現性のいずれもが優れているという長所を有する。

【実施例】

以下、実例をあげて本発明を更に具体的に説明する。

実例1

尿素1%、硫酸0.75%、リン酸0.5%の水溶液1Lを2L容ジャーファメンターに入れ、1N水酸化ナトリウムにてPHを4.5にした後、滅菌処理した。次にサッカロミセス・セレビシア(IFO 0304)10g(乾燥菌体重量)を接種して、滅菌した菌液密漬液(菌液密3.9%含有)800mlを50ml/hで滴下して培養を行った(30℃、PH4.5一定)。尚、溶存酸素が常に2～5ppmとなるように、指數増殖期には、純酸素を供給した。

実例2～6

実例1において、金属塩の種類と添加量を変えて実験した結果を示す。

	金属塩の種類と添加量 (対反応液重量%)	β-ヒドロキシ 酢酸エチルの 収率	β-ヒドロキシ 酢酸エチルの (S)体純度
実例2	硫酸第二鉄(7水和物) 0.15%	88%	95%ee
実例3	硫酸アルミニウム(17水和物) 0.10%	82%	95%ee
実例4	硫酸第二クロム(9水和物) 0.10%	78%	95%ee
実例5	硫酸セリウム 0.05%	85%	97%ee
実例6	硫酸インジウム 0.02%	88%	94%ee

実例7～10

実例1において基質の種類のみを変えて実験した結果を示す。(対照例は硝酸第二鉄の添加なしの場合である。)

	基質の種類	還元体の収率	還元体の(S)体 立体配置と 光学純度
実例7	γ-クロラルアセト酢酸オクチル	90%	(R) 95%ee
対照例	—	85%	(R) 90%ee
実例8	β-ケトベントノ酸エチル	85%	(S) 94%ee
対照例	—	50%	(S) 89%ee
実例9	α-ブロムアセト酢酸メチル	82%	(S) 92%ee
対照例	—	53%	(S) 90%ee
実例10	αメチルアセト酢酸ブチル	85%	(S) 95%ee
対照例	—	61%	(S) 90%ee

実例11～19

YM培地（酵母エキス4g、麦芽エキス10g、グルコース1g、水1l）に、次表に示す菌を接種し、28℃で40時間培養後、処理し、蒸留水で1回洗浄した菌体を反応に供した。

即ち、500ml容瓶口フラスコに水100mlを入れ、これに洗浄菌体を所定量添加して菌懸濁液を作成した。

次に、塩化第二鉄0.2%と硝酸第二クロム（9水和物）0.1%を添加した後、次表に示すアセト酢酸エステルを所定量添加し、28℃、3時間振とう反応させた後、酢酸エチル100mlを投入して搅拌し、抽出操作を行った。酢酸エチル層をロータリーエバボレーターにかけ酢酸エチルを留去して抽出残渣を得た。この抽出残渣について分析した結果を示す（対照例は金属塩の添加なしの場合である）。

反応実験番号	菌の過剰量 (乾燥重量)	反応時間		過剰元塩残量 (乾燥重量)
		初期	終期	
実例11 トルコブレスカシジ (170 0318)	7.0	アセト酢酸メチル	2.0	8.7 9.1%
对照例				
実例12 ロドムラバリダ (170 0715)	5.5	アセト酢酸エチル	3.3 9.0 9.0%	9.5%
对照例				
実例13 オーレオバシジウム ブルランス (170 0401)	5.5	アセト酢酸メチル	3.3 9.5 9.2%	9.3%
对照例				
実例14 トリコスボロン クラニウム (170 0717)	7.0	アセト酢酸エチル	1.5 8.7 9.0 9.0%	9.5%
对照例				
実例15 チバリオミセス サク (170 0606)	6.5	アセト酢酸エチル	1.5 9.0 9.6 9.6%	9.5%
对照例				
実例16 クリフトコッカス ルオフモーマンス (170 0146)	8.0	アセト酢酸メチル	1.0 8.6 8.9 8.9%	9.0%
对照例				
実例17 カシジ ユティリス (170 0304)	5.0	アセト酢酸メチル	2.0 9.5 9.1 9.1%	9.5%
对照例				
実例18 アリオクラジウム ロゼウム (170 0422)	6.5	アセト酢酸エチル	1.0 8.5 8.5 8.5%	9.0%
对照例				
実例19 アスペルギルス フラブス (170 0205)	7.0	アセト酢酸メチル	2.0 8.8 9.0 9.0%	9.5%
对照例				

〔効 果〕

以上のように、本発明において特定の金属イオンを添加することによって、 β -ケト酸類から β -ヒドロキカルボン酸類を製造することができ、光学純度、收率のいずれについても良好な結果が得られた。

特許出願人 日本合成化学工業株式会社